

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04723

研究課題名(和文) 多機能性ハイブリッド型ワクチンプラットフォームを基盤としたマラリアワクチンの開発

研究課題名(英文) Malaria vaccine development based on multifunctional hybrid vaccine platform

研究代表者

吉田 栄人 (Yoshida, Shigeto)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：10296121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：熱帯熱マラリア感染防御(PfCSP)および感染防御-伝播阻止(Pfs25-PfCSP)両機能を搭載したコンポーネント-DNAハイブリッド型BDESワクチン、組換えアデノウイルスの作製を完了した。マウスモデルの免疫実験では、非常に高い抗PfCSPおよび抗Pfs25抗体価を誘導し、PfCSP特異的なIFN-gの産生も観察された。最も重要な感染防御効果もほぼ100%であり、BDESワクチン、組換えアデノウイルスを用いたheterologous prime-boost immunizationでは、99%の伝播阻止効果を達成することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We have generated baculovirus- and adenovirus-based malaria vaccines expressing Plasmodium circumsporozoite protein (PfCSP) or PfCSP-Pfs25 fusion protein. Immunization of mice with these viral-vectored vaccines induced high anti-PfCSP and Pfs25 antibody titers and cellular immune responses. These results clearly demonstrated that our vaccines possess multifunctional effects on induction of both humoral and cellular immune responses. We successfully achieved sterile protective efficacy of our vaccines against sporozoite challenge. Moreover, heterologous prime-boost immunization regime using baculovirus- and adenovirus-PfCSP-Pfs25 elicited 99% transmission blocking activity. The present study shows great potential of our vaccines as next-generating malaria vaccines.

研究分野：感染免疫学

キーワード：マラリア ワクチン 感染防御 スポロゾイト

1. 研究開始当初の背景

複雑な生活環をもつマラリア原虫に対し、マルチステージワクチン開発が必要：「感染防御ワクチン」である RTS,S ワクチン (GSK 社：マラリア抗原 PfCSP と HBsAg との融合タンパクと特殊アジュバンドが成分) は、アフリカでの第 III 相臨床試験でわずか 30% の有効率しかなく、改良が望まれている。一方、マラリア感染者から蚊への伝播を阻止することによりコミュニティ全体を守る「伝播阻止ワクチン」は、その重要度は認識されているが、被接種者には直接メリットがないため単価ワクチンでの実用化は困難である。このため、より効果的でスペクトルが広い感染防御-伝播阻止両機能を併せ持つマルチステージワクチンの開発が望まれている。しかし、マルチステージワクチンの問題は、各ステージの単価ワクチンを混合しただけでは免疫干渉が生じ、効果が激減することにある (Elias et al., J Immunol 2013)。免疫干渉を回避でき、さらに非侵襲性の点鼻・経口接種が可能な次世代ワクチンプラットフォームの開発が望まれている。

「感染防御ワクチン」は細胞性・液性両免疫応答を誘導するハイブリッド機能が必要：蚊から注入されたスポロゾイト期マラリア原虫は、血流に乗って肝臓に達し、侵入して増殖する。肝臓に達するまでは液性免疫応答が有効であり、肝臓に侵入してからは細胞性免疫応答が必要である。この両免疫応答を効率よく誘導するハイブリッド型ワクチンプラットフォームが望まれているが、現在はまだこのようなシステムプラットフォームは開発されていない。

バキュロウイルスは安全性の高い多機能性次世代ワクチンプラットフォームとして有望：バキュロウイルスはヒトに感染性はないが、CMV プロモーターを用いれば哺乳類細胞に遺伝子導入 (ウイルス複製なく細胞内に取り込まれ遺伝子発現) することができる。我々は臨床応用に向けて、副反応がないことを大規模アカゲザル (42 頭) 実験による安全性試験で確認している。一方、バキュロウイルスは *in vivo* において補体により不活化されることが弱点であり、これが臨床応用への大きな障害となっている。我々は独自のアイデアで改良を加え、安全性の高い多機能性 BDES-NVP ワクチンプラットフォームを開発した。

2. 研究の目的

【全体構想】非感染性バキュロウイルスナノ粒子ワクチンシステム (BDES-NVP: Non-infectious Viral Particle Baculovirus Dual Expression System) を技術基盤として、ワクチン開発が困難とされるマラリアワクチン開発に挑戦する。他のウ

イルスベクターと組み合わせた Heterologous Prime-Boost 免疫法も検討する。臨床応用を明確にした橋渡し研究であり、動物モデルを出発点として BDES-NPV の First-in-Human 試験に向けてワクチン効果を立証する。

【具体的な目的】熱帯熱マラリア感染防御のみ、および感染防御-伝播阻止両機能を搭載したコンポーネント-DNA ハイブリッド型 BDES-NVP ワクチン、アデノウイルスワクチンを作製し、遺伝子組換えマラリア原虫を用いて動物モデルで両ワクチン効果を評価する (達成目標 > 90% 効果)。液性・細胞性免疫を解析し、両ワクチン効果との相関関係を明らかにする。ユニークな自然免疫を賦活化するアジュバント効果のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

多機能性ハイブリッド型 (マラリア感染防御-伝播阻止) 1 価、2 価 BDES-NVP ワクチン、アデノウイルスワクチンを構築・評価：BDES-NPV とは、非感染性バキュロウイルスを技術基盤として独自に開発・改良したワクチンプラットフォームである。

抗原性の解析 1 (提示型コンポーネントワクチン機能)：BDES-NVP ウイルス粒子上に PfCSP あるいは Pfs25-PfCSP-G 融合タンパクが提示発現していることを熱帯熱マラリア感染患者血清 3,000 サンプルをプローブとしたウエスタンブロッティングで確認する。補体抵抗因子 DAF による i) ウイルス粒子のシールド、ii) 補体存在下でのウイルス形状を免疫電顕で観察する。

抗原性の解析 2 (細胞内発現型 DNA ワクチン機能)：BDES-NVP の特長は、哺乳動物細胞に取り込まれて抗原を発現し、MHC-I に提示することにより細胞性免疫を強力に誘導する能力 (DNA ワクチン機能) である。BDES-NVP を哺乳類細胞に導入 (トランスダクション) し、モノクローナル抗体および熱帯熱マラリア感染患者血清をプローブとした間接蛍光抗体法で Pfs25-PfCSP-G 融合タンパクの細胞内発現を観察する。

免疫原性の解析：BDES-NVP、組換えアデノウイルスをマウスに筋注接種し、ELISA により PfCSP、Pfs25 に対する抗体価を測定する。使用する ELISA 抗原は大腸菌で発現した組換え Pfs25、PfCSP タンパクを用いる。複数の抗原に対する免疫応答を調べ、BDES-NPV の大きな利点である免疫干渉回避メカニズムの解析も行う。

感染防御実験：BDES-NVP、組換えアデノウイルスをマウス (合計 60 匹) に 3 週おき 3 回筋注免疫する。各回の免疫直前に部分採血して、後日 ELISA により抗体価の変動を測定し、ブースター効果を調

べる。最終免疫の2週間後に遺伝子組換え原虫 PfCSP/Pb が感染したハマダラカで吸血チャレンジする。チャレンジ5-14日後にギムザ染色した血液薄層塗沫標本を作製し、顕微鏡で感染の有無、原虫増殖率を観察・測定し、感染防御効果を評価する。

ワクチンメカニズム、自然免疫応答メカニズムの解析: 各回の免疫-感染防御実験で得られる血清、細胞を用いて抗体価、細胞性免疫応答を調べ、ワクチン効果との相関関係を解析する。BDES-NPV、組換えアデノウイルスが誘導するアジュバント効果は、組換えタンパク+アラムアジュバント接種群と対比解析する。

4. 研究成果

熱帯熱マラリア感染防御および感染防御-伝播阻止両機能を搭載したコンポーネント-DNA ハイブリッド型 BDES ワクチン、組換えアデノウイルスの作製を完了した。熱帯熱マラリア原虫のワクチン候補抗原 Pfs25 と PfCSP 両遺伝子を BDES-NPV、アデノウイルスに導入し、BDES-PfCSP, Pfs25-PfCSP, AdHu5-PfCSP, AdHu5-Pfs25-PfCSP を構築した。機能評価としてウェスタンブロッティング法による抗原タンパクの発現確認(コンポーネントワクチン機能解析)および共焦点顕微鏡による動物細胞へのトランスダクション発現確認(DNA ワクチン機能解析)を終え、作製したワクチンが予定通り十分な機能を有していることを確認した。

前述の BDES-PfCSP, Pfs25-PfCSP, AdHu5-PfCSP, AdHu5-Pfs25-PfCSP の in vitro 機能解析および in vivo ワクチン効果解析から、下記の成果を得た。(1)Pfs25-PfCSP 融合型 BDES ワクチンを作製し、ウイルス粒子上にこの融合タンパクが発現・提示されていることをウェスタンブロッティングで確認した。(2)BDES の特長である哺乳類細胞への transduction 効率を間接蛍光抗体法により確認した。膜非透過条件でも強いシグナルが細胞膜に検出されたことから、効率よく膜表面に Pfs25-PfCSP 融合型タンパクが提示されていることが明らかとなった。(3)Pfs25-PfCSP 融合型 AdHu5 ワクチンを作製し、この融合タンパクが発現・提示されていることをウェスタンブロッティングおよび FIA で確認した。(4)AdHu5-prime/BDES-boost heterologous 免疫法を用いて、マウスへの接種実験を行い、細胞性免疫については ELISPOT 法で PfCSP ペプチド特異的な IFN-g 産生細胞の存在が確認され、液性免疫については ELISA 法により抗 PfCSP, 抗 Pfs25 抗体産生が確認された。(5)感染防御および伝播阻止効率をマウスモデルで評価するために、Pfs25-PfCSP double chimeric transgenic parasites を作製し、PFS25, PFCSP の発現を

確認した。(5)免疫マウスに Pfs25-PfCSP double chimeric transgenic parasites をチャレンジ感染させたところ、100%の完全感染防御効果を達成することに成功した(論文作成中)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

- (1) Yoshida K, Iyori M, Blagborough AM, Salman AM, Dulal P, Sala KA, Yamamoto DS, Khan SM, Janse CJ, Biswas S, Yoshii T, Yusuf Y, Tokoro M, Hill AVS, Yoshida S.: Adenovirus-prime and baculovirus-boost heterologous immunization achieves sterile protection against malaria sporozoite challenge in a murine model. *Sci Rep.*, 8(1):3896, 2018. (査読有り)
- (2) Iyori M, Blagborough AM, Sala KA, Nishiura H, Takagi K, Yoshida S.: Protective efficacy of an IL-12-expressing baculoviral malaria vaccine. *Parasite Immunol.*, In press, 2017. (査読有り)
- (3) Iyori M, Yamamoto DS, Sakaguchi M, Mizutani M, Ogata S, Nishiura H, Tamura T, Matsuoka H, Yoshida S.: DAF-shielded baculovirus-vectored vaccine enhances protection against malaria sporozoite challenge in mice. *Malar J*, 16:390, 2017. (査読有り)
- (4) Mizutani M, Fukumoto S, Soubeiga AP, Soga A, Iyori M, Yoshida S.: Development of a *Plasmodium berghei* transgenic parasite expressing the full-length *Plasmodium vivax* circumsporozoite VK247 protein for testing vaccine efficacy in a murine model. *Malar J*, 15(1):251, 2016. (査読有り)
- (5) Tamura T, Kawabata C, Matsushita S, Sakaguchi M, Yoshida S.: Malaria sporozoite protein expression enhances baculovirus-mediated gene transfer to hepatocytes. *J Gene Med.* 18(4-6):75-85, 2016. (査読有り)
- (6) Tamura T, Kimura K, Yui K, Yoshida S.: Reduction of conventional dendritic cells during Plasmodium infection is dependent on activation induced cell death by type I and II interferons. *Exp Parasitol.*, 159:127-35, 2015. (査読有り)

- (7) Sala KA, Nishiura H, Upton LM, Zakutansky SE, Delves MJ, Iyori M, Mizutani M, Sinden RE, Yoshida S, Blagborough AM.: The Plasmodium berghei sexual stage antigen PSOP12 induces anti-malarial transmission blocking immunity both in vivo and in vitro. Vaccine.33:437-445, 2015. (査読有り).

〔学会発表〕(計 23 件)

- (1) 伊従光洋. ウイルスベクターを基盤としたマラリアワクチンの開発. 日本薬学会第 138 年会 2017 年 3 月 25-28 日 ホテル金沢(金沢)
- (2) 堀 直人. 伊従光洋. 吉田 邦嵩. Talha Bin EMRAN. 島田 聡. 志田 壽利. 吉田 栄人. 組換えワクシニアウイルス LC16m8 のマラリアワクチン効果. 日本薬学会第 138 年会 2017 年 3 月 25-28 日 TKP 金沢新幹線口会議室(金沢)
- (3) 吉井 達也. 伊従光洋. 吉田 邦嵩. 島田 聡. Yenni YUSUF. 水上 浩明. 吉田 栄人. アデノ随伴ウイルスベクターを用いたマラリアワクチン開発研究. 日本薬学会第 138 年会 2017 年 3 月 25-28 日 TKP 金沢新幹線口会議室(金沢)
- (4) 大塚 広夢. 島田 聡. 伊従光洋. 吉田 邦嵩. 吉田 栄人. ウイルスベクターと組換えタンパクを組み合わせたマラリアワクチンの開発研究. 日本薬学会第 138 年会 2017 年 3 月 25-28 日 TKP 金沢新幹線口会議室(金沢)
- (5) Yenni YUSUF. 吉田 邦嵩. 伊従光洋. 吉井 達也. 橋爪 洋樹. 島田 聡. 水上 浩明. 山本 大介. 福本晋也. 吉田 栄人. アデノウイルスとアデノ随伴ウイルスを用いた heterologous prime-boost immunization によるマラリアワクチンの開発研究. 日本薬学会第 138 年会 2017 年 3 月 25-28 日 TKP 金沢新幹線口会議室(金沢)
- (6) Ashekul ISLAM. 伊従光洋. 山本 大介. Talha Bin EMRAN. 都野 展子. 山口 莉理夏. Henrique SILVEIRA. 吉田 栄人. コラーゲン誘導性血小板凝集阻害活性を有するハマダラカ唾液タンパク AAPP の機能を喪失すると吸血行動が制限される日本薬学会第 138 年会 2017 年 3 月 25-28 日 TKP 金沢新幹線口会議室(金沢)
- (7) Fitri A. 伊従光洋. 玄師 健人. 尾上 裕太郎. Talha B E. Yenni Y. 吉田 栄人. マラリア PfCSP タンパクのワクチン抗原としての免疫原性および感染防御効果の検討. 日本薬学会第 138 年会 2017 年 3 月 25-28 日 TKP 金沢新幹線口会議室(金沢)
- (8) Islam A, Talha B E, Yamamoto D, Iyori M, Fitri A, Yenni Y, Tuno N, Yoshida S. Transgene mediated inhibition of collagen-induced platelet aggregation by Anopheline Anti-Platelet Protein, regulates probing time and blood feeding success in malaria vector mosquito Anopheles stephensi 第 35 回北陸病害動物研究会 2017 年 7 月 1 日金沢医科大学(金沢)
- (9) Alam A, Iyori M, Yoshida K, Yusuf Y, Katarzyna A Sala, Blagborough AM, Takashima E, Tsuboi T, Yoshida S. Protective efficacy of viral vectored Plasmodium falciparum malaria vaccines by the prime-boost immunization regimen 第 86 回日本寄生虫学会 2017 年 5 月 28-29 日北海道大学(札幌)
- (10) 伊従光洋, 吉田 邦嵩, Salman Ahmed, Dulal Pawan, Khan Shahid, Biswas Sumi, 所 正治, Andrew Blagborough, Adrian Hill, 吉田 栄人. Protective efficacy of viral vectored Plasmodium falciparum malaria vaccines by the prime-boost immunization regimen 第 86 回日本寄生虫学会 2017 年 5 月 28-29 日北海道大学(札幌)
- (11) Yoshida K, Iyori M, Salman A M, Dulal P, Khan S M, Janse C J, Biswas S, Tokoro M, Blagborough A M, Hill A V S, Yoshida S. Plasmodium falciparum CSP vaccine based on a heterologous adenovirus prime and baculovirus-boost immunization regimen confers sterile protection against transgenic P. berghei sporozoite challenge The U.S. Japan Cooperative Medical Sciences Program Presents the 19th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) 2017 年 2 月 7 日 -10 日 Seoul (韓国)
- (12) Iyori M, Blagborough A M, Ogata S, Nishiura H, Sakaguchi M, Mizutani M, Tamura T, Genshi K, Shimada S, Yamamoto D, Matsuoka M, Yoshida S. Vectored PfCSP Vaccines based on Baculovirus Dual Expression System and AdHu5 induce Strong Protective Efficacy against Transgenic Plasmodium berghei 65th ASTMH Annual Meeting 2016.11.13-17 Atlanta,

- (13) Yoshida K, Iyori M, Amed M. Salman, Pawan Dulal, Shahid M. Khan, Chris J. Janse, Sumi Biswas, Masaharu Tokoro, Andrew M. Blagborough, Adrian V.S. Hill, Yoshida S. A hybrid *Plasmodium falciparum* malaria vaccine based on adenovirus-prime and baculovirus-boost immunization regimen 第 57 回日本熱帯医学会大会 2016 年 11 月 5-6 日 一橋大学(東京)
- (14) 吉田邦嵩, Ahmed M. Salman, Pawan Dulal, Shahid M. Khan, Chris J. Janse, Sumi Biswas, 所正治, 伊従光洋, Andrew M. Blagborough, Adrian V.S. Hill, 吉田栄人. アデノウイルスベクターとバキュロウイルスベクターを用いた新規ワクチンプラットフォームによる熱帯熱マラリアワクチンの開発 72 回日本寄生虫学会西日本支部大会 2016 年 10 月 15-16 日岐阜大学(岐阜)
- (15) Yoshida K, A. M. Salman, Pawan D. Shahid M. Khan, Chris J. Janse, Sumi Biswas, Tokoro M, Iyori M., Andrew M. Blagborough, Adrian V. S. Hill, Yoshida S. A hybrid *Plasmodium falciparum* malaria vaccine based on adenovirus-prime and baculovirus-boost immunization regimen. 第 14 回松山国際学術シンポジウム 2016 年 9 月 15-26 日 愛媛大学(松山)
- (16) 伊従光洋, 吉田栄人. 蚊唾液タンパクの能動免疫によるネズミマラリア原虫に対する感染防御効果. 第 68 回日本衛生動物学会 2016 年 4 月 16 日 栃木県総合文化センター(宇都宮)
- (17) 伊従光洋, 藤吉里紗, Syafruddin Din, 吉田栄人. Antibody response against the *Anopheles* salivary gland protein reflects *Plasmodium falciparum* infection during the rainy season in Indonesia 第 85 回日本寄生虫学会 2016 年 3 月 19-20 日 宮崎市民プラザ(宮崎)
- (18) Alam A, Chauhan V S, Yoshida S. Potential role of serine protease PfSUB3 for *Plasmodium falciparum* parasite 第 85 回日本寄生虫学会 2016 年 3 月 19-20 日 宮崎市民プラザ(宮崎)
- (19) Emran Talha B., 天野隆之, Fitri Amelia, Asrar Alam, 松岡裕之, 小川良平, 伊従光洋, 吉田栄人. Baculovirus-induced innate immunity confers 100% protection against sporozoite challenge in a mouse model 第 85 回日本寄生虫学会 2016 年 3 月 19-20 日 宮崎市民プラザ(宮崎)
- (20) 田村隆彦, 川井悠輔, 川端千明, 松下俊介, 坂口美亜子, 吉田栄人. 組織標的性を持つ遺伝子導入ベクターとしての次世代バキュロウイルスの開発 第 38 回日本分子生物学会年会 2015 年 12 月 4 日 ポートアイランド(神戸)
- (21) 川井悠輔, 田村隆彦, 吉田栄人. 補体抵抗性バキュロウイルスの作成とその評価. 日本薬学会北陸支部第 127 回例会 2015 年 11 月 15 日 富山大学(富山)
- (22) Iyori M., Fujiyoshi R, Syafrudin D, Yoshida S. Differential antibody response to the *Anopheles stephensi* AAPP and *Plasmodium* antigens in individuals naturally exposed to bites of afrotropical malaria vectors. 64th ASTMH Annual meeting, 2015.10.25. Philadelphia Marriott Downtown (US)
- (23) 伊従光洋, 中山隆弘, 藤吉里紗, 吉田栄人. 高速原子間力顕微鏡を用いたハマダラカ由来唾液タンパク観察の試み. 第 33 回北陸病害動物研究会 2015 年 6 月 13 日 金沢大学(金沢)

〔産業財産権〕
出願状況(計 2 件)

名称: マラリアワクチン
発明者: 吉田栄人
権利者: 国立大学法人金沢大学
種類: 特許
番号: 特願 2018-038100
出願年月日: 2018 年 3 月 2 日
国内外の別: 国内

名称: マラリア治療剤、マラリア予防剤及び抗マラリア自然免疫賦活剤
発明者: 吉田栄人
権利者: 国立大学法人金沢大学
種類: 特許
番号: 特願 2018-057311
出願年月日: 2018 年 3 月 23 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者
吉田 栄人 (YOSHIDA Shigeto)
金沢大学・薬学系・教授
研究者番号: 10296121

(2) 研究分担者
伊従 光洋 (IYORI Mitsuhito)
金沢大学・薬学系・准教授
研究者番号: 20608351